

Abstract for DE 4240980:

S1 1 PN="DE 4240980"

?t s1/9/1

1/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009764436

WPI Acc No: 1994-044287/199406

Related WPI Acc No: 2000-149113

XRPX Acc No: N94-035093

New hepatitis C virus peptide antigens and fragments - useful as diagnostic immunoassay reagents, in vaccines and for prodn. of antibodies used to detect the virus

Patent Assignee: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (BOEF ); ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (HOFF )

Inventor: BAYER H; IHLENFELDT H G; JUNG G; SEIDEL C; WIENHUES U; IHLENFELDT H

Number of Countries: 019 Number of Patents: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 582243	A2	19940209	EP 93112337	A	19930802	199406 B
DE 4240980	A1	19940210	DE 4240980	A	19921205	199407
AU 9344399	A	19940210	AU 9344399	A	19930802	199411
CA 2103533	A	19940208	CA 2103533	A	19930806	199417
JP 6247997	A	19940906	JP 93196193	A	19930806	199440
AU 655112	B	19941201	AU 9344399	A	19930802	199504
ZA 9305716	A	19950426	ZA 935716	A	19930806	199522
EP 582243	A3	19950315	EP 93112337	A	19930802	199542
US 5674676	A	19971007	US 93102738	A	19930806	199746
JP 2666903	B2	19971022	JP 93196193	A	19930806	199747
EP 582243	B1	20000209	EP 93112337	A	19930802	200012
			EP 99113825	A	19930802	
DE 59309950	G	20000316	DE 509950	A	19930802	200021
			EP 93112337	A	19930802	
ES 2143996	T3	20000601	EP 93112337	A	19930802	200033

Priority Applications (No Type Date): DE 4240980 A 19921205; DE 4226093 A 19920807

Cited Patents: No-SR.Pub; EP 318216; EP 388232; EP 484787; EP 489968; WO 9301210

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 582243	A2	G	29	C07K-007/04	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU NL SE					
DE 4240980	A1		20	C07K-007/08	
AU 9344399	A			C07K-007/08	
CA 2103533	A			C12P-021/08	
JP 6247997	A		17	C07K-007/08	
AU 655112	B			C07K-007/08	Previous Publ. patent AU 9344399
ZA 9305716	A		41	C07K-000/00	
EP 582243	A3			C07K-007/04	
US 5674676	A		14	C12Q-001/70	
JP 2666903	B2		17	C07K-007/06	Previous Publ. patent JP 6247997





①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 40 980 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 K 7/08**  
C 07 K 15/28  
A 61 K 37/02  
C 07 K 7/06

②1 Aktenzeichen: P 42 40 980.2  
②2 Anmeldetag: 5. 12. 92  
④3 Offenlegungstag: 10. 2. 94

DE 42 40 980 A 1

③0 Innere Priorität: ③2 ③3 ③1  
07.08.92 DE 42 26 093.0

⑦1 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:  
Seidel, Christoph, Dr.rer.nat., 8120 Weilheim, DE;  
Wienhues, Ursula, Dr.rer.nat., 8000 München, DE;  
Bayer, Hubert, Dr.rer.nat., 8120 Weilheim, DE; Jung,  
Günther-Gerhard, Prof. Dr.rer.nat., 7400 Tübingen,  
DE; Ihlenfeldt, Hans-Georg, 7400 Tübingen, DE

⑤4 HCV Peptidantigene und Verfahren zur Bestimmung von HCV

⑤7 Es werden neue HCV Peptidantigene beschrieben. Diese Peptidantigene sind zur Bestimmung von HCV-Antikörpern als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern gegen HCV und als Vakzine zur Herstellung von Impfstoffen gegen HCV geeignet.

DE 42 40 980 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue HCV Peptidantigene, ein Verfahren zur Herstellung dieser Peptidantigene, sowie ein Verfahren zur Bestimmung von HCV unter Verwendung der Peptidantigene.

Das Vorkommen von Virushepatitis in Abwesenheit serologischer Marker von bisher bekannten hepatotropen Agenzien (z. B. Hepatitis-A-Virus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis- $\Delta$ -Virus, Cytomegalie-Virus und Epstein-Barr-Virus) wird als Non-A, Non-B-Hepatitis (NANB-Hepatitis) bezeichnet. NANB-Hepatitis wird wiederum unterteilt in parenteral und sporadisch übertragene Non-A, Non-B-Hepatitis und enteral übertragene Non-A, Non-B-Hepatitis. Für die parenteral und sporadisch übertragene NANB-Hepatitis wurde vor kurzem das ursächliche Agens, das Hepatitis-C-Virus (HCV) isoliert (Choo Q.-L. et. al. Science 244 (1989) 359—362 und Kuo, G. et. al. Science 244 (1989) 362—364).

HCV ist weltweit eine wichtige Ursache von NANB-Hepatitis und wird durch kontaminiertes Blut oder Blutprodukte, Blutübertragungen oder durch engen persönlichen Kontakt übertragen.

Die Aminosäuresequenz der HCV-Virusproteine ist aus EP-A 0 318 216, EP-A 0 363 025, EPA 388 232 und EP-A 0 396 748 bekannt. Das Genom des HCV hat eine Länge von 10862 nt. Die durch Translation hervorgehenden Proteine besitzen eine Gesamtlänge von ca. 3000 Aminosäuren. Die Proteine lassen sich in Strukturproteine (Hülle- und Kernproteine) und Nicht-Strukturproteine (NS1—NS5) einteilen.

Die Bestimmung von HCV erfolgt zweckmäßig dadurch, daß durch immunologische Tests Antikörper gegen HCV in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Für derartige immunologische Tests werden deshalb Bindepartner für Anti-HCV-Antikörper benötigt.

So ist es bekannt, in immunologischen Tests beispielsweise das nicht-strukturelle C 100-3-HCV-Protein als Bindepartner zu verwenden (Tests von ABBOTT LABORATORIES, USA und ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC., USA; Science 244 (1989) 359—364; Van der Poel C. L. et. al. Lancet 337 (1991) 317; Alter H. J. J. Gastroent. Hepatol. (suppl.) 1990, 78).

Nachteil dieser Tests ist, daß als Antigen ein rekombinantes Protein verwendet wird. Proteine sind wegen ihrer Denaturierungsanfälligkeit und damit verringerter Löslichkeit und Funktion in diagnostischen Tests schwer zu handhaben. Auch die Größe des Meßsignals ist aufgrund der niedrigen Epitopdichte auf einem Protein geringer als bei einem Test, bei dem ein kurzkettiges Peptidantigen als Bindepartner des Antikörpers verwendet wird. Weiter können bei Verwendung von Proteinen oder langkettigen Peptiden als Antigene in einem immunologischen Test vermehrt Kreuzreaktivitäten und unspezifische Bindungen von Antikörpern auftreten. Reaktionen mit Proteinen sind zudem oft diffusionskontrolliert, was den erwünschten kurzen Zeiten für immunologische Tests entgegensteht. Außerdem ist die Herstellung von für die Diagnostik einsetzbarem Protein in ausreichender Menge und Qualität zeitraubend und kostenintensiv. Peptide sind durch Synthese leicht zugänglich und sind definierte Moleküle.

Es ist demzufolge vorteilhaft, in einem immunologischen Test auf Anti-HCV-Antikörper möglichst kurzkettige Peptidantigene, die nur Ausschnitte der gesamten Proteine darstellen, zu verwenden. Ein derartiges immunologisches Verfahren ist von Okamoto (Japan J. Exp. Med. 60 (1990) 223—234) beschrieben. Es hat sich jedoch gezeigt, daß das dort beschriebene kurzkettige Peptidantigen (Sequenz 9), welches aus der core-Region stammt, nicht ausreichend sensitiv für HCV ist.

Weitere HCV-Peptidantigene sind in der Deutschen Patentanmeldung P 42 09 215.9 beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Peptidantigene zur Verfügung zu stellen, die spezifisch für Anti-HCV-Antikörper sind und für immunologische Tests auf Anti-HCV-Antikörper geeignet sind.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Peptidantigene der Sequenzen

— 7B6: LDGVRLHRFAPPCKPLLR  
— 7A5: LHQWISSECTTPCSGSWLRDI  
— NS5/1: SRRFAQALPVWARP  
— 7B12: NKVVILGSFDPLVAEEDEREI  
— 6F10: PSHITAEAAAGRRLARG  
— 7A1: SRGNHVSPTHYVPESDAA  
— 8C3: LLLLAAGVGIYLLPN

oder Peptidantigene, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens vier, vorzugsweise von mindestens sieben, Aminosäuren Länge darstellen.

Geeignete Teilsequenzen sind in den Sequenzprotokollen dargestellt. Besonders bevorzugte Teilsequenzen sind:

aus Sequenz 7A1

— NS4/3a: HVSPTHYVP  
— NS4/3b: VSPTHYVPE  
— NS4/3: HVSPTHYVPE

aus Sequenz NS5/1

— 7D/2: ALPVWARP  
— NS5/1b: FAQALPVWA

Besonders bevorzugt werden Teilsequenzen, deren Länge maximal 9 Aminosäuren beträgt, insbesondere

# DE 42 40 980 A1

die Substanzen NS4/3 und NS5/1b. Ein besonders bevorzugtes Peptidantigen ist NS5/1.

Die Durchführung eines Anti-HCV-Antikörper-Nachweis erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Bestimmung von HCV-Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Probe mit mindestens einem Peptidantigen aus der Gruppe der Sequenzen SEQ ID NO 1—11 und 20 oder Peptidantigenen, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens vier, vorzugsweise von mindestens 7, Aminosäuren Länge darstellen, inkubiert und unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigenkomplexes ermöglichen, die Menge der an das Peptidantigen gebundenen Anti-HCV-Antikörper bestimmt wird.

Dabei werden die erfindungsgemäßen Peptidantigene vorzugsweise in einem Konzentrationsbereich von 1—1000 ng/ml, besonders bevorzugt von 20—250 ng/ml eingesetzt.

Erfindungsgemäß wird eine Kombination von mindestens zwei der erfindungsgemäßen Peptidantigene oder Teilsequenzen davon bevorzugt verwendet. Besonders bevorzugt ist es, mindestens ein Peptidantigen der Sequenzen SEQ ID NO: 1—11 und 20 oder Teilsequenzen davon mit mindestens einem Peptidantigen aus der Gruppe der Sequenzen SEQ ID NO: 12—19 oder Teilsequenzen davon zu kombinieren.

Die Sequenzen SEQ ID NO: 12—19 und ihre Herstellung sind in der deutschen Patentanmeldung P 42 09 215.9, deren Inhalt Gegenstand der Offenbarung der vorliegenden Patentanmeldung ist, beschrieben.

Die Kombination der Antigene kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß mehrere einzelne Peptidantigene verwendet werden oder daß Peptidantigene kovalent, zweckmäßig über eine Aminosäurenbrücke, die sich von natürlicherweise in HCV-Proteinen vorkommenden Aminosäuren-Sequenz folgen unterscheidet oder einen Peptid-Linker, aneinander gebunden sind.

Besonders bevorzugt sind Kombinationen der Antigene:

- Sequenz 4a, 6e, 6b, 2e, 2g, NS4/3, NSS/1 (Kombination 1)
- Sequenz 4a, 6e, 6b, 2e, 2g, NS4/3 (Kombination 2)
- Sequenz 4a, 2g, 2e, 6c, NS4/3, NS5/1 (Kombination 3)
- Sequenz 4a, 6e, 6b, 2e, 2g, NS4/3a, NS4/3b, NS5/1b (Kombination 4)
- Sequenz 4a, 6e, 6b, 2e, 2g, NS4/3, NS5/1, 9c (Kombination 5)
- Sequenz 4a, 2g, NS4/3, 2e, 6c, NS5/1, 9c (Kombination 6)
- Sequenz 4a, 6, 2e, 2g, 7A1, NS5/1 (Kombination 7).

Folgende Sequenzen sind in der P 42 09 215.9 beschrieben:

Antigen	Sequenzprotokoll in P 42 09 215.9 SEQ ID NO:	Sequenzprotokoll in der vorliegen- den Anmeldung SEQ ID NO:
4a	13	12
6b	18	13
6e	21	14
2e	7	15
2g	9	16
6c	19	17
9c	28	18
6	16	19

In diesen Kombinationen werden die Antigene bevorzugt in folgenden Mengen verwendet:

	Antigen	Menge in Kombination [ng/ml]	
		Bereich	bevorzugter Bereich
5	4a	20 - 200	40 - 70
	6e	20 - 200	50 - 80
10	6b	20 - 200	40 - 70
	2e	5 - 100	15 - 30
	2g	5 - 75	15 - 25
15	NS4/3	10 - 120	25 - 40
	NS5/1	3 - 25	5 - 10
	6c	30 - 500	120 - 170
20	NS4/3a	20 - 200	45 - 60
	NS4/3b	30 - 250	80 - 90
	NS5/1b	40 - 400	120 - 140
25	9c	100 - 1000	300 - 400
	7A1	10 - 120	25 - 40
	6	20 - 200	50 - 80
30	8C3	100 - 750	200 - 350

Vorzugsweise werden die Antigene einzeln, ohne kovalente Bindung aneinander, oder kovalent aneinander gebunden unter Verwendung eines Peptid-Linkers eingesetzt.

Auf Grund der erhöhten Empfindlichkeit, die bei dem Infektionsparameter HCV notwendig ist, werden vorzugsweise zum Nachweis heterogene Immunoassays verwendet. Diese heterogenen Tests erlauben Waschschritte, die den Meßsignal-Hintergrund erheblich reduzieren wodurch die Empfindlichkeit gesteigert wird.

Beispielsweise kann die Bestimmung durch einen Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay oder durch Immunfluoreszenz erfolgen. Üblicherweise wird hierzu das Peptidantigen immobilisiert. Die Probe, welche auf Anti-HCV-Antikörper untersucht werden soll, wird zugegeben und die an das Antigen gebundenen Antikörper über einen markierten Anti-Human-Immunglobulin-Antikörper bestimmt. Die Immobilisierung des erfindungsgemäßen Peptidantigens kann adsorptiv, kovalent oder über ein biologisches Bindungspaar wie Biotin/Streptavidin, Antikörper/Antigen, oder Zucker/Lektin erfolgen. Dabei wird das Peptidantigen an diesen Partner kovalent gebunden.

Die erfindungsgemäßen Peptidantigene können für Immunoassays vorzugsweise nach dem Fachmann geläufigen Methoden, beispielsweise an Kugeln (beads), Kunststoffröhrchen oder Mikrotiterplatten (bevorzugt Polystyrol oder Copolymere von Polystyrol), immobilisiert werden. Dies erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Peptidantigen unspezifisch an der Oberfläche adsorbiert oder kovalent an funktionalisierte oder aktivierte Oberflächen gebunden wird. Die unspezifische Adsorption kann dadurch verbessert werden, daß man das Peptidantigen mit einem Protein zu einem Konjugat verknüpft und dieses Konjugat zur Adsorption verwendet (vgl. z. B. EP-A 0 269 092). Die Bindung kann auch über einen immobilisierten Antikörper erfolgen. Dazu sollte das Peptidantigen so verändert werden, daß das Epitop nicht durch die Bindung des Antikörpers blockiert wird z. B. durch Bildung eines Peptid-Protein-Konjugats.

Die Konjugation des Peptidantigens an den Bindungspartner erfolgt vorzugsweise über einen Spacer. Dieser Spacer enthält zweckmäßig 10—50, vorzugsweise 10—30 Atome und ist ebenfalls bevorzugt ein im wesentlichen lineares Molekül. Beispiele hierfür sind Spacer aus Alkyl-, Polyether- oder Polyamidketten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist ein Peptidantigen einer Länge von 4—9 Aminosäuren über einen linearen Spacer von 10—30 Atomen an den Träger gebunden. Falls ein Spacer aus Aminosäuren verwendet werden soll, besteht dieser zweckmäßig aus Aminosäuren, die nicht der Sequenzfolge in unmittelbarer Umgebung des Peptidantigens im HCV-Gen entsprechen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Peptidantigen kovalent an Biotin gebunden, wobei die Immobilisierung über eine Avidin/Streptavidin-Festphase erfolgt.

Ebenso geeignet sind Bestimmungsverfahren, bei denen die Detektion nicht über einen markierten Antikörper, sondern über ein markiertes, weiteres Peptidantigen, welches eine der in SEQ ID NO 1—20 gezeigten Sequenzen oder eine Teilsequenz davon aufweist, erfolgt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptidantigene ist nach den dem Fachmann geläufigen Methoden zur Peptidsynthese möglich. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung des

erfindungsgemäßen Peptidantigens, welches darin besteht, daß die das C-terminale Ende bildende Aminosäure an einen Träger gebunden wird, vom C-terminalen Ende das Peptidantigen schrittweise aufgebaut und anschließend vom Träger abgespalten wird.

Im einzelnen wird dazu eine Aminosäure beispielsweise über ihre Carboxygruppe an ein unlösliches, leicht filtrierbares Polymer geknüpft, und dann vom C-terminalen Ende her die Peptidkette schrittweise aufgebaut. Zu diesem Zweck wird eine N-geschützte Aminosäure mit einer reaktiven Gruppierung des Kunstharzes zur Reaktion gebracht. Von der am Trägerpartikel kovalent verankerten Aminosäure wird die N $\alpha$ -Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Von dem am Trägerharz kovalent gebundenen Dipeptid wird die N $\alpha$ -Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Alle überschüssigen Reagentien und Beiprodukte werden durch einfaches Filtrieren entfernt. Ist die gewünschte Peptidsequenz auf diese Weise hergestellt, wird die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppierung des polymeren Trägers gespalten. Der unlösliche Träger wird durch einfache Filtration von dem nun in Lösung befindlichen Peptid entfernt. Das Peptid wird mittels chromatographischer Methoden gereinigt.

Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Peptidantigene nach Merrifield, JACS 85 (1964) 2146 hergestellt werden. Eine gegebenenfalls erforderliche Biotinylierung kann beispielsweise nach PNAS USA 80 (1983) 4045 erfolgen. Ein bevorzugtes Biotinylierungsmittel hierfür ist Biotinylaminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von biotinylierten Peptidantigenen ist die Einführung des Biotinrestes am N-Terminus während einer Festphasensynthese des Peptidantigens.

Dieses Verfahren wird bevorzugt dann verwendet, wenn das Peptidantigen mehrere  $\epsilon$ -Lysin-Aminogruppen enthält, die nicht biotinyliert werden sollen. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn man N- $\alpha$ -Fmoc-N- $\epsilon$ -biotinyl-aminocaproyl)lysin, N- $\alpha$ -Fmoc-N- $\epsilon$ -Biotinyllysin oder bei Biotinylierung der N-terminalen Aminosäuren Biotin, Biotinylaminocaprinsäure oder Dimethoxytritylbiotin mit einem Aktivierungsreagenz wie zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid oder als Aktivester einsetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird ein Nachweisantikörper der beispielsweise gegen den Fc-Teil von humanem IgG gerichtet ist, immobilisiert. Vorzugsweise wird hierzu ein monoklonaler Antikörper verwendet. Das Peptidantigen befindet sich dann in Lösung. Der nachzuweisende Antikörper (Analyt) und auch alle anderen Antikörper der Probenflüssigkeit werden vom Wandantikörper gebunden. Der gebundene Antikörper kann dann den Analyten binden, der mit einem geeigneten Nachweissystem, z. B. kompetitiv mit einem Peptidantigen-Enzymkonjugat nachgewiesen werden kann.

Mit den erfindungsgemäßen Peptidantigenen ist es auch möglich, durch die dem Fachmann geläufigen Verfahren der Immunisierung Antikörper zu erhalten, mit denen das Virus selbst in einem immunologischen Test nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Säugetier mit einem erfindungsgemäßen Peptid, welches gegebenenfalls an einen Träger gebunden ist, immunisiert wird und die Antikörper nach bekannten Verfahren z. B. aus dem Serum oder der Milz gewonnen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agenzien mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert, die Zelllinie, welche die gewünschten Antikörper produziert, kloniert und kultiviert und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die monoklonalen Antikörper gewonnen.

Mit diesem Antikörper ist es möglich, HCV-Viren direkt zu bestimmen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Bestimmung von HCV-Viren, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Probe mit einem erfindungsgemäßen Antikörper unter Bedingungen, die eine Antigen-Antikörperkomplexbildung erlauben, inkubiert, und die Menge des gebildeten Antikörper-Antigenkomplexes bestimmt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Peptidantigene sowie ein Vakzin zur Behandlung von HCV-Infektionen, enthaltend als Immunogen mindestens ein gegebenfalls trägergebundenes Peptidantigen mit der in SEQ ID NO 1-11 und 20 gezeigten Sequenz oder Teilsequenzen davon in einer pharmakologisch effektiven Dosis und in einer pharmazeutisch akzeptablen Formulierung.

Die Herstellung dieser Impfstoffe kann nach den bekannten Methoden durchgeführt werden. Bevorzugt werden jedoch die Peptidantigene zunächst lyophilisiert und anschließend, ggf. unter Zusatz von Hilfsstoffen, suspendiert.

Die Impfung mit dem erfindungsgemäßen Vakzin oder Vakzinkombinationen kann durch die dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intradermal, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, subkutan und intranasal.

Zur intramuskulären oder subkutanen Gabe kann das Vakzin beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sein. Zur intranasalen oder intraoccularen Applikation kann das Vakzin, beispielsweise in Form eines Sprays oder einer wäßrigen Lösung angewendet werden. Für lokale, beispielsweise orale Gabe ist es häufig erforderlich, die Immunogene zeitweise gegen Inaktivierung zu schützen, beispielsweise gegen proteolytische Enzyme in der Mundhöhle oder im Magen. Ein derartiger vorübergehender Schutz kann beispielsweise durch Verkapselung der Immunogene erfolgen. Diese Verkapselung kann beispielsweise durch Überziehen mit einem Schutzmittel (Mikroverkapselung) oder bei Einbettung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Immunogenen in einen schützenden Träger (Makroverkapselung) erfolgen.

Das Verkapselungsmaterial kann semipermeabel sein oder beim Einbringen in den menschlichen oder tierischen Körper semipermeabel werden. Üblicherweise wird für die Verkapselung eine biologisch abbaubare Substanz als Träger verwendet.

# DE 42 40 980 A1

Die nachfolgenden Beispiele und Sequenzprotokolle erläutern die Erfindung weiter.  
In den Sequenzprotokollen bedeuten:

	Antigen	SEQ ID NO
5	7B6	1
	7A5	2
	NS5/1	3
10	7B12	4
	6F10	5
	7A1	6
	NS4/3a	7
	NS4/3b	8
15	NS4/3	9
	7D/2	10
	NS5/1b	11
	4a	12
20	6b	13
	6e	14
	2e	15
	2g	16
	6c	17
25	9c	18
	6	19
	8C3	20

## Beispiel 1

### Synthese von H-SRRFAQALPVWARP-OH (NSS/1)

Das Peptid wurde mittels Fmoc(Fluorenyloxycarbonyl)-Festphasensynthese hergestellt. Die Reaktionen wurden an einem Labortec (Schweiz) SP 640 Peptidsynthesizer durchgeführt. Die Kupplungsreaktionen wurden bezüglich Fmoc-Aminosäure-Derivat mit 2.4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 2.2 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol während 90 Minuten durchgeführt. Als Reaktionsmedium kam Dimethylformamid zum Einsatz. Die Fmoc-Gruppe wurde mittels 20% Piperidin in DMF in 10 und 20 Minuten abgespalten. 2.0 Äquivalente von den folgenden Aminosäure-Derivaten kamen zum Einsatz: Pro, Arg(mit PMC (Pentamethylchroman)-Schutzgruppe), Ser(mit tert.-Butyl-Schutzgruppe), Trp, Asp (mit tert.-Butylester-Schutzgruppe) Phe, Ala, Gln, Leu, Val. Die Kupplungsreaktionen wurden mit der Hälfte der Reagentien wiederholt. Der Kupplungserfolg wurde mittels Kaiser-Test (Anal. Biochemistry 34 (1970) 595) geprüft, die Harzbeladung wurde mittels UV-Absorption der freigesetzten Fulven-Gruppe nach jeder Piperidin-Spaltung ermittelt. Das Peptid wurde an 5 g Wang-Harz (Polystyrol/1% Divinylbenzol) mit einer Ladung von 0.50 mMol/g synthetisiert (JACS 95 (1973) 1328). Nach der Synthese betrug der Beladungsgrad noch 0.39 mMol/g.

Die Freisetzung des Peptids wurde mit 200 ml Trifluoressigsäure, 200 ml Dichlormethan, 10 ml Ethandithiol, 10 ml m-Kresol, 5 ml Ethylmethylsulfid und 5 ml Wasser in 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Abspaltung wurde mehrmals mit Toluol eingeeengt, dann das Peptid mit Diethylether gefällt.

Zur Entfernung der Scavenger und anderer kleiner Moleküle wurde das Rohmaterial über eine Sephadex G10-Säule gereinigt. Es wurden nach Lyophilisieren 2.4 g Material einer Reinheit von 31% (RP-HPLC) erhalten. Um das Material auf die Endreinheit von >95% zu bringen, wurden 250 mg Peptid über eine präparative RP-HPLC-Säule (40mm·250mm) gefüllt mit C18-Material (5 Mikrometer, 300 Angström) und einem Wasser/Trifluoressigsäure-, Acetonitril/Trifluoressigsäure-Gradienten gereinigt. Es fielen nach Lyophilisation 48 mg 95.2%iges (HPLC) weißes Material an. Die Identität des Materials wurde mittels FAB-MS geprüft.

## Beispiel 2

Zur Biotinylierung des Peptidantigens aus Beispiel 1 wurde ein Moläquivalent möglichst konzentriert (Löslichkeit ist von der Aminosäuresequenz abhängig) in Argon-gesättigtem Kaliumphosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 8,0) gelöst und mit 3 Äquivalenten D-Biotinyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester gelöst in Argon-gesättigtem Dimethylformamid (Lösung von 1 µmol Reagenz in 5 µl DMF) versetzt.

Man rührte das Reaktionsgemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon unter ständiger Kontrolle mittels analytischer RP-HPLC. Wenn <5% Edukt vorhanden waren, wurde der Reaktionsansatz direkt auf eine präparative RP-HPLC-Säule gegeben und das Produktmaterial mittels einem 0.1% Trifluoressigsäure/Wasser- zu 0.1% Trifluoressigsäure/Acetonitril-Gradienten (Steigung: 0% auf 100% in 90 Minuten) gereinigt. Das Produktmaterial wurde durch Einengen und Lyophilisation der Produktfraktionen erhalten. Die Ausbeuten lagen zwischen 40% und 90%. Als Analytik dienten für die Reinheit HPLC, HPCE und TLC, für die Identität LSI-MS (Molpeak) und TLC mit spezifischen Anfärbereagentien (p-Dimethylaminozimtaldehyd auf Biotin) und Gehalts-



# DE 42 40 980 A1

bestimmung über Mikroanalyse (Nitrogen).

## Beispiel 3

HCV-Antikörper werden in einem 2-Schritt-Sandwich-Immunoassay bestimmt. Zum Nachweis werden die Reagentien mit folgender Zusammensetzung verwendet: 5

### Reagenz 1

Kombinationen 1—6 der Peptidantigene, biotinylierte Peptidantigene oder Peptidantigene allein. 10

40 mmol/l Phosphatpuffer pH 7.0  
0.9 Gew.-% NaCl  
10 Vol.-% Rinderserum

### Reagenz 2 15

20 mU/ml eines Konjugats aus polyklonalem Antikörper gegen humanes Immunglobulin (Schaf) und Peroxidase

40 mmol/l Phosphatpuffer pH 7.0 20  
0.05 Gew.-% Tween® 20  
0.2% Rinderserumalbumin  
0.2% Rinder-IgG.

In einem mit Streptavidin beschichteten Polystyrolröhrchen (hergestellt nach Beispiel 1 von EP-A 0 344 578) werden 1 ml Reagenz 1 und 10 µl Probe eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dreimal mit Leitungswasser gewaschen und mit 1 ml Reagenz 2 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Zur Nachweisreaktion werden 1 ml ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]-Diammoniumsalz, 1,9 mmol/l, in 100 mmol/l Phosphatcitratpuffer pH 4.4 mit 3.2 mmol/l Natrium-perborat) zugegeben. Nach 60 min wird die Extinktion bei 420 nm photometrisch gemessen. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen I, II und III. 25 30

### Erläuterungen zu den Tabellen

—/+: negativ/positiv (Der Cutoff für ein positives Signal im ELISA ist definiert als die mittlere Extinktion bei 420 nm plus 3 Standardabweichungen eines Kollektivs von 10 negativen Kontrollseren. Die Proben wurden bei einer Probenverdünnung von 1 : 250 vermessen). 35

Als Antigenkonzentrationen wurden verwendet:

a) als einzelnes Antigen im Test 40

Antigen	Menge [ng/ml]
---------	---------------

7B6	200
7A5	200
NS5/16	130
NS5/1	85
7D2	200
7B12	200
6F10	70
7A1	200
8C3	300

 45 50

b) in den Kombinationen 55

60

65

# DE 42 40 980 A1

Antigen	Menge [ng/ml] in Kombination						
	1	2	3	4	5	6	7
4a	52	65	52	50	50	52	52
6e	58	73	-	58	55	-	-
6b	52	65	-	50	50	-	-
2e	20	25	20	20	18	20	20
2g	17	21	17	17	15	17	17
NS4/3	30	38	30	-	27	30	-
NS5/1	7	-	7	-	7	7	7
6c	-	-	150	-	-	150	-
NS4/3a	-	-	-	51	-	-	-
NS4/3b	-	-	-	83	-	-	-
NS5/1b	-	-	-	130	-	-	-
9c	-	-	-	-	350	350	-
7A1	-	-	-	-	-	-	30
6	-	-	-	-	-	-	65



# DE 42 40 980 A1

Tabelle II

Serum	Antigenmischung					
	1	2	3	4	5	6/7
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+
16	-	-	+/-	-	-	+/-
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	-	-	+/-	-	-	+/-
20	+	+	+	+	+	+
21	-	-	+/-	-	-	+/-
22	-	-	-	-	-	-
23	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+

DE 42 40 980 A1

Tabelle III  
Serum                      Antigen 8C3

B1	—	
B2	—	5
B3	+	
B4	+/-	
B5	—	
B6	—	
B7	+/-	10
B8	+	
B9	+	
B10	+	
B11	—	15
B12	—	
B13	+	
B14	+	
B15	—	
B16	—	20
B17	+	
B18	+	
B19	+	
B20	+	
S25	+	25
01	—	
56	+	
Negativ-control	—	30

35

40

45

50

55

60

65

DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 1

5 ART DER SEQUENZ: Peptid  
SEQUENZLÄNGE: 18 Aminosäuren

10 Leu Asp Gly Val Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu  
1 5 10 15  
15 Leu Arg

20 SEQ ID NO: 2

25 ART DER SEQUENZ: Peptid  
SEQUENZLÄNGE: 21 Aminosäuren

30 Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser  
1 5 10 15  
35 Trp Leu Arg Asp Ile  
20

40  
SEQ ID NO: 3

45 ART DER SEQUENZ: Peptid  
SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

50  
Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp  
55 1 5 10 15

60

65

DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 4

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 21 Aminosäuren

Asn Lys Val Val Ile Leu Gly Ser Phe Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu  
1 5 10 15  
Asp Glu Arg Glu Ile  
20

SEQ ID NO: 5

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 16 Aminosäuren

Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly  
1 5 10 15

SEQ ID NO: 6

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 18 Aminosäuren

Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp  
1 5 10 15  
Ala Ala

DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 7

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro  
1 5

SEQ ID NO: 8

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu  
1 5

SEQ ID NO: 9

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 10 Aminosäuren

His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu  
1 5 10



DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 10

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp

1 5

SEQ ID NO: 11

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala

1 5

SEQ ID NO: 12

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg

5

DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 13

5

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

10

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Phe

5

15

20

SEQ ID NO: 14

ART DER SEQUENZ: Peptid

25

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

30

Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly

5

35

SEQ ID NO: 15

40

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

45

Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln

50

5

55

60

65

DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 16

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr

5

SEQ ID NO: 17

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 12 Aminosäuren

Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val

5

10

SEQ ID NO: 18

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr

5

10

15

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# DE 42 40 980 A1

SEQ ID NO: 19

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 16 Aminosäuren

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly  
5 10 15  
Val

SEQ ID NO: 20

ART DER SEQUENZ: Peptid

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn  
5 10 15

## Patentansprüche

1. HCV Peptidantigene mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 1—6 oder mit Teilsequenzen davon mit mindestens 4 Aminosäuren Länge.

2. HCV Peptidantigene nach Anspruch 1 mit Teilsequenzen von maximal 9 Aminosäuren Länge.

3. HCV Peptidantigene nach Anspruch 2 mit den Teilsequenzen SEQ ID NO: 7, 8, 10, 11.

4. HCV Peptidantigene gemäß Anspruch 1 mit den Teilsequenzen SEQ ID NO: 1 oder 9.

5. Kombination von HCV-Peptidantigenen aus

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9, 3 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9 oder

SEQ ID NO: 12, 16, 15, 17, 9, 3 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 7, 8, 11 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9, 3, 18 oder

SEQ ID NO: 12, 16, 9, 15, 17, 3, 18 oder

SEQ ID NO: 12, 19, 15, 16, 6, 3.

6. Verfahren zur Herstellung von Peptidantigenen nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die das C-terminale Ende bildende Aminosäure an einen Träger gebunden wird, vom C-terminalen Ende das Peptidantigen schrittweise aufgebaut und anschließend vom Träger abgespalten wird.

7. Verfahren zur Bestimmung von HCV-Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einer Kombination von mindestens zwei Peptidantigenen aus der Gruppe SEQ ID NO: 1—6 oder Peptidantigenen, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens 4 Aminosäuren Länge darstellen, inkubiert und, unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigenkomplexes ermöglichen die Menge der an das Peptidantigen gebundenen HCV-Antikörper bestimmt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kombination mindestens ein Peptidantigen mit 4—9 Aminosäuren Länge enthält, welches eine Teilsequenz von SEQ ID NO: 7, 8, 10, 11 darstellt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kombination zusätzlich mindestens ein HCV-Antigen aus der Gruppe SEQ ID NO 12—19 enthält.

10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kombination mindestens ein Peptidantigen aus der Gruppe SEQ ID NO: 3 und 9 enthält.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Kombinationen

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9, 3 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9 oder

SEQ ID NO: 12, 16, 15, 17, 9, 3 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 7, 8, 11 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9, 3, 18 oder

SEQ ID NO: 12, 16, 9, 15, 17, 3, 18 oder

SEQ ID NO: 12, 19, 15, 16, 6, 3

verwendet werden.

12. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen HCV-Antigene, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem gegebenenfalls trägergebundenen Peptidantigen SEQ ID NO: 1—6 oder einer Teilsequenz davon immunisiert wird, polyklonale Antikörper gewonnen werden oder Zellen dieser Tiere, die Antikörper produzieren, zu Zelllinien immortalisiert werden und aus diesen Zelllinien monoklonale Antikörper gewonnen werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Peptidantigene, die Teilsequenzen dar-

# DE 42 40 980 A1

stellen, SEQ ID NO: 7—11 verwendet werden.

14. Verfahren zur Bestimmung von HCV-Viren, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Antikörper nach Anspruch 12 oder 13 unter Bedingungen, die eine Antigen-Antikörperkomplexbildung erlauben, inkubiert wird, und die Menge des gebildeten Antikörper-Antigenkomplexes bestimmt wird.

15. Vakzin zur Behandlung von HCV-Infektionen, enthaltend mindestens ein gegebenenfalls trägergebundenes Peptidantigen SEQ ID NO: 1—6 oder Peptidantigene, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens 4 Aminosäuren Länge darstellen als Immunogen, in einer pharmakologisch effektiven Dosis und in einer pharmazeutisch akzeptablen Formulierung.

16. Vakzin nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Peptidantigene, die Teilsequenzen

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9, 3 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9 oder

SEQ ID NO: 12, 16, 15, 17, 9, 3 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 7, 8, 11 oder

SEQ ID NO: 12, 14, 13, 15, 16, 9, 3, 18 oder

SEQ ID NO: 12, 16, 9, 15, 17, 3, 18 oder

SEQ ID NO: 12, 19, 15, 16, 6, 3

verwendet werden.

17. Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der Peptidantigene SEQ ID NO: 1—6 oder Peptidantigene, die Teilsequenzen dieser Peptidantigene von mindestens 4 Aminosäuren Länge darstellen, als Immunogene.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

- Leerseite -